

低温条件下と有機溶媒で貯蔵した *Malus* 属植物花粉の発芽

樋浦 巖*・西村達弘**・渡辺 薫**・鈴木 洋**
(石黒学園*・山形大学農学部農業生産学講座**)
(平成5年9月1日受理)

Germination Viability of *Malus* spp. Pollens under Conditions of Storage by Low Temperatures and Organic Solvents

Iwao HIURA*, Tatuhiro NISHIMURA**, Kaoru WATANABE**, Hiroshi SUZUKI**
College ISHIGURO Gakuen*, Section of Agricultural Production**
Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan
(Received September 1, 1993)

Summary

Conditions of low temperature (5°C, -20°C, -196°C, -20°C → -196°C) and 4 organic solvents (xylene, toluene, benzene, ethyl ether) were given to *Malus* spp. pollen.

Effects on the germination viability were as follows:

1. Pollen viability were lost within 2~4 months of storage under room temperature and 5°C.
2. Pollen viability under -20°C storage conditions were maintained more than 4 months in the storage conditions by organic solvents having more than 4 carbon bases. But those germination rates were lower than its viability immediately after collection.
3. Pollen viability under -196°C storage were maintained after 8 months. But its viability was superior than that immediately after collection.
4. Pollen viability under -20°C → -196°C condition stood about at the same rate as that immediately after collection.
5. The degree of pollen tube elongation was increased with the increase of pollen germination rate.

緒 言

筆者等はリンゴ台木または栽培樹の樹種同定に資するための形質を追求するために、1970年以来収集した *Malus* 属数種の植物を用いて育成した実生群の開花到達樹に現われる形態学的形質を検討して来た(樋浦 他 1974, '78, '86, '90)⁴⁾⁵⁾⁸⁾¹¹⁾。

このような育種のための素材となる種の系統関係を明らかにするためのもう一つの有力な方法として種間交雑を実施して相互の交配親和性を調べたり、雑種実生植物に現われる形質と両親種のそれとを比較することも重要と考えられる。

この場合、開花期の異なる種相互間の組合せによる交

配も考えられ、その際に花粉の長期貯蔵が可能であれば交配作業上好都合であろう。

これらの成果は単に *Malus* 属台木の分類のみならず、リンゴの育種や、栽培場面での着果の確保という面からも意味のある知見を提供するであろう。このような目的で、すでいくつかの植物花粉を保存する容器内に不活性ガスを入れたり⁹⁾、真空中に近い減圧状態で凍結乾燥を行なって保存したり⁶⁾⁷⁾、低温下に貯蔵する方法¹⁰⁾が試みられているが、とりわけ一年以上にもわたる長期の貯蔵のために液体窒素等を用いた超低温(液体窒素:-196°C)下の貯蔵が検討されて来た¹⁾。一方これとは別に有機溶媒中における花粉貯蔵の可能性を岩波ら²⁾³⁾が明らかにした。

そこで今回は、*Malus* の野生種、栽培種両種の花粉について、これら2つの質的に異なる貯蔵法を単独または組合せて適用することを試みた。

材料および方法

山形大学農学部圃場において栽植されている *Malus* 属の数種植物による実生群の幼若期 (Juvenile phase) を経た開花到達樹について、花器形態形質ならびに葉によるアイソザイム分析に基づき分類同定した (坂本 '90)⁸⁾ *Eumalus* sect. (マルバカイドウ節) の *M. pumila* var. *domestica* (栽培種) : 品種 旭 (McIntosh), 紅玉 (Jonathan), *M. prunifolia* : 系統ガー2, *M. baccata* : 系統ガー31ならびに *Sieboldii* sect. (ミツバカイドウ節) の *M. sieboldii* : 系統羽黒を用い1985年と1990年に実験を行った。

花粉は当研究室考案の花粉採取器により、開葯した葯のうより採取したものを顕微試料用の固定瓶 (1×2.5 cm) に有機溶媒とともに密封した。有機溶媒は3種類の芳香族炭化水素 (キシレン; 炭素数8, トルエン; 炭素数7, ベンゼン; 炭素数6), エチルエーテル (炭素数4) を用いた。貯蔵温度は室温 (デシケーター), 5℃ (恒温器), -20℃ (冷蔵庫), -196℃ (液体窒素) とした。なお液体窒素処理に際して予備凍結操作は行なわなかった。その他変温処理として、-20℃より-196℃への移行区を設けたが、その移行時期は発芽率の急激低下

時期以降 (貯蔵後2か月ならびに4か月) とした。

発芽試験のためには、貯蔵花粉を有機溶媒とともにスポイトで吸い上げ、40℃恒温器中で揮発操作を行い供試した。発芽率は寒天1%, ショ糖10%の発芽培地による25℃、置床3時間後の結果で示し、この調査は貯蔵開始後2か月ごとに5回行った。

なお、無能花粉 (abortive pollen) の判定はアセトカーミンに対する染色反応の有無で行った。

貯蔵花粉の花粉管伸長は、1990年の-20℃, -196℃, -20℃→-196℃での有機溶媒貯蔵実験において、貯蔵花粉の発芽率の調査と同様、置床3時間後における花粉管の伸長を調査した。花粉の直径以上に花粉管の伸長したものを発芽と見なし、各処理区毎に10視野を測定しそれらを集計し各区2反復の平均で示した。

結果および考察

貯蔵花粉の発芽能力

花粉採取直後

第1表に示すように栽培種の品種間差異と、*M. siebo.* 系統: 羽黒の無能花粉歩合の高率とその低い発芽率が目立った。

1990年の実験における花粉管の伸長程度は、系統: 羽黒のみ50μと低く、他は256.1~374.4μであり大きな差がなかった。

Table 1 Pollen germination viability on the agar media immediately after collection.

| Scientific name | Cultivar or line | Germination rate (%) ¹⁾ | | Abortive pollen rate (%) ²⁾ | |
|--|------------------|------------------------------------|------|--|------|
| | | 1985 | 1990 | 1985 | 1990 |
| <i>Malus pumila</i> var. <i>domestica</i> cv | McIntosh (旭) | 24.7 | 33.7 | 42.9 | 30.0 |
| " | Jonathan (紅玉) | 91.4 | 55.6 | 4.7 | 5.6 |
| <i>M. prunifolia</i> line | GA-2 (ガー2) | 77.5 | 51.9 | 21.7 | 4.8 |
| <i>M. baccata</i> line | GA-31 (ガー31) | 88.3 | 67.4 | 2.4 | 7.0 |
| <i>M. sieboldii</i> line | Haguro (羽黒) | 5.0 | 3.0 | 61.3 | 50.0 |

1) Abortive pollens were counted by the degree of stainig ability with aceto carmine.

2) Pollens were counted from 10 focuses/dish.

有機溶媒と温度の組合せを変えて貯蔵した場合

1) 室温区

貯蔵2か月後には有機溶媒処理区の発芽は認められず2か月以内に発芽力を失ったものと推定された。

2) 5℃区

貯蔵2か月後に殆どの溶媒区で発芽は認められなかったが、炭素数8個のキシレン区にあって、品種、旭(20%)、紅玉(12.4%)、*M. pruni.*：系統ガー2(24.2%)、炭素数7個のトルエン区にあって系統ガー2(28.0%)に発芽が認められた。また紅玉はエチルエーテル区で7.9%の発芽率を示した。しかし、これらはどれも花粉採取時(第1表)に比べて低い発芽率であり、また貯蔵140日後にはいずれも発芽力を失っていた。従って、次年度の実験にはこれらの温度区は設定しなかった。

3) -20℃区

a 1985年結果：

栽培種 品種：旭；キシレン区は貯蔵2か月後には花粉採取時の発芽率24.7%より高い値を示し、その後貯蔵期間の増加に伴い発芽率は低下し、7か月後には5%程度の発芽率となった。その他の溶媒区はどれも貯蔵開始後からその期間の増加に伴い発芽率は低下し、7か月後には5%程度の発芽率となった。

栽培種 品種：紅玉；いずれの区も貯蔵期間の増加に伴い発芽率は花粉採取時の91.4%より低い値を示したが、貯蔵7か月後の発芽率は35~60%程度であった。

M. pruni. 系統：ガー21；キシレン区を除き栽培種紅玉と同様の発芽経過を示しながら花粉採取時の77.5%より低い発芽率となったが、貯蔵7か月の発芽率は10~50%程度であった。なお、キシレン区は貯蔵4か月で発芽力を失った。

M. bacc. 系統：ガー31；いずれの区も貯蔵後の発芽率は花粉採取時の88.3%より低くなったが、その程度は小さく貯蔵7か月後の発芽率は65~80%程度であった。

M. siebo. 系統：羽黒；いずれの区も貯蔵2か月後で発芽力を失った。

b 1990年結果(第1図)：いずれの系統、品種ともに貯蔵2か月後に発芽率の急上昇が認められ、花粉採取時よりも高い値を示し、1985年の結果とは異なった。その後の発芽経過は以下のようであった。

栽培種 品種：旭；キシレン、トルエン区は貯蔵6か月後まで急激な発芽率の低下を示し、8か月後にやや回復したが、その発芽率は花粉採取時の33.7%より低かった。ベンゼン区は貯蔵4か月後に発芽率の低下を示し、

8か月後には発芽力を失った。エチルエーテル区では同様の経過を経て6か月後に発芽力を失った。

栽培種 品種：紅玉；いずれの区も発芽率の低下の程度は旭より緩慢であったが、貯蔵8か月後の発芽率は花粉採取時の55.8%より低くなっていた。

M. pruni. 系統：ガー2；発芽率の低下程度は栽培品種と同様の傾向であったが、エチルエーテル区は貯蔵4ヶ月後、トルエン区は6ヶ月後、キシレン、ベンゼン区は8か月後に発芽力を失った。

M. baccata 系統：ガー31；貯蔵8か月後にキシレン区は発芽力を失ったが、トルエン区は花粉採取時の発芽率67.4%に近い値を示し、一方ベンゼン、エチルエーテル区の発芽率は極めて低い値を示した。

M. siebo. 系統：羽黒；無能花粉が多く、有機溶媒貯蔵の影響は明らかでなく、貯蔵2か月後に発芽力を失っていた。

花粉管伸長：

第3・4図に示したように、-20℃、有機溶媒貯蔵後の花粉管伸長程度は、品種：旭および2種の野生種で漸減傾向を示した。これに対し品種：紅玉では、最終8か月に至るまで低下することなく、出発時の値を越える伸長を見せた。

以上の結果からは、発芽能力のある花粉についてはその花粉管の伸長が長期間保たれる種類も一部認められたが、発芽率低下の推移を見る限り、-20℃単独区による実用的な花粉貯蔵は期待出来ないように思われた。

4) -20℃→-196℃移行区(1990年結果：第1図)

a 栽培種については液体窒素移行操作を貯蔵開始2か月後に行った。

栽培種 品種旭：移行2か月後(貯蔵開始後4か月)いずれの区も発芽率は低下したが、キシレン区はその後回復し、移行6か月後(貯蔵開始8か月)では花粉採取時の33.7%と殆ど変わらない発芽率を示した。トルエン区は移行4か月後に花粉採取時より高い発芽率を示したが、移行6か月後に花粉採取時より低い値となった。ベンゼン区は移行後発芽率の低下が続き、6か月後に20%程度となった。エチルエーテル区は操作を誤り結果は得られなかった。

栽培種 品種：紅玉；旭同様に移行2か月後に発芽率の低下を示したが、いずれの区もその後一度発芽率の上昇を示したが、移行6か月後には花粉採取時の55.6%よりやや低い程度となり、最も低い値を示したベンゼン区でも50%程度であった。

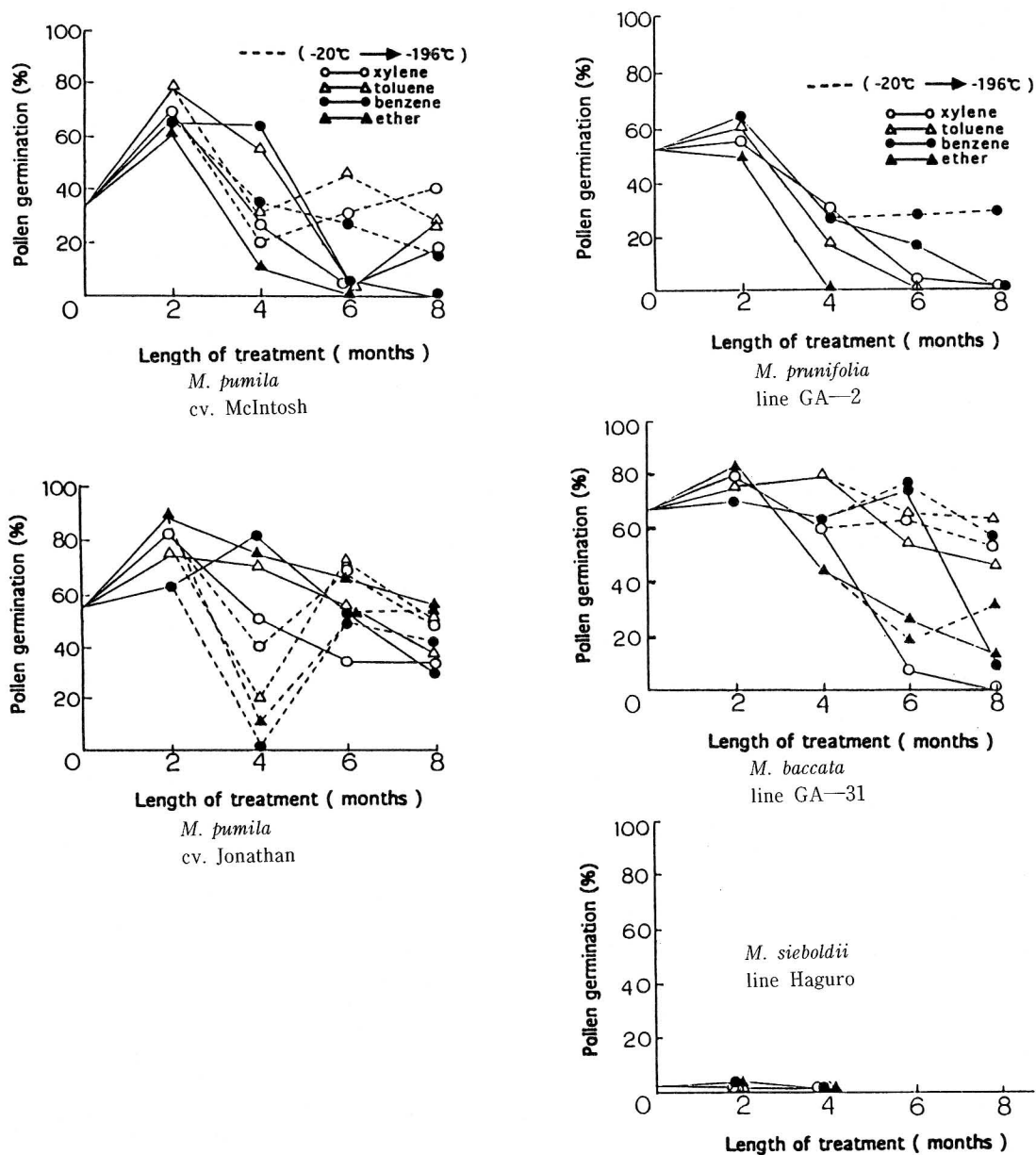


Fig. 1 Effects of temperatures (-20°C^z and $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C}$) and organic solvents on pollen germination rate.

^z: Solid lines of graphs show the data at -20°C storage.

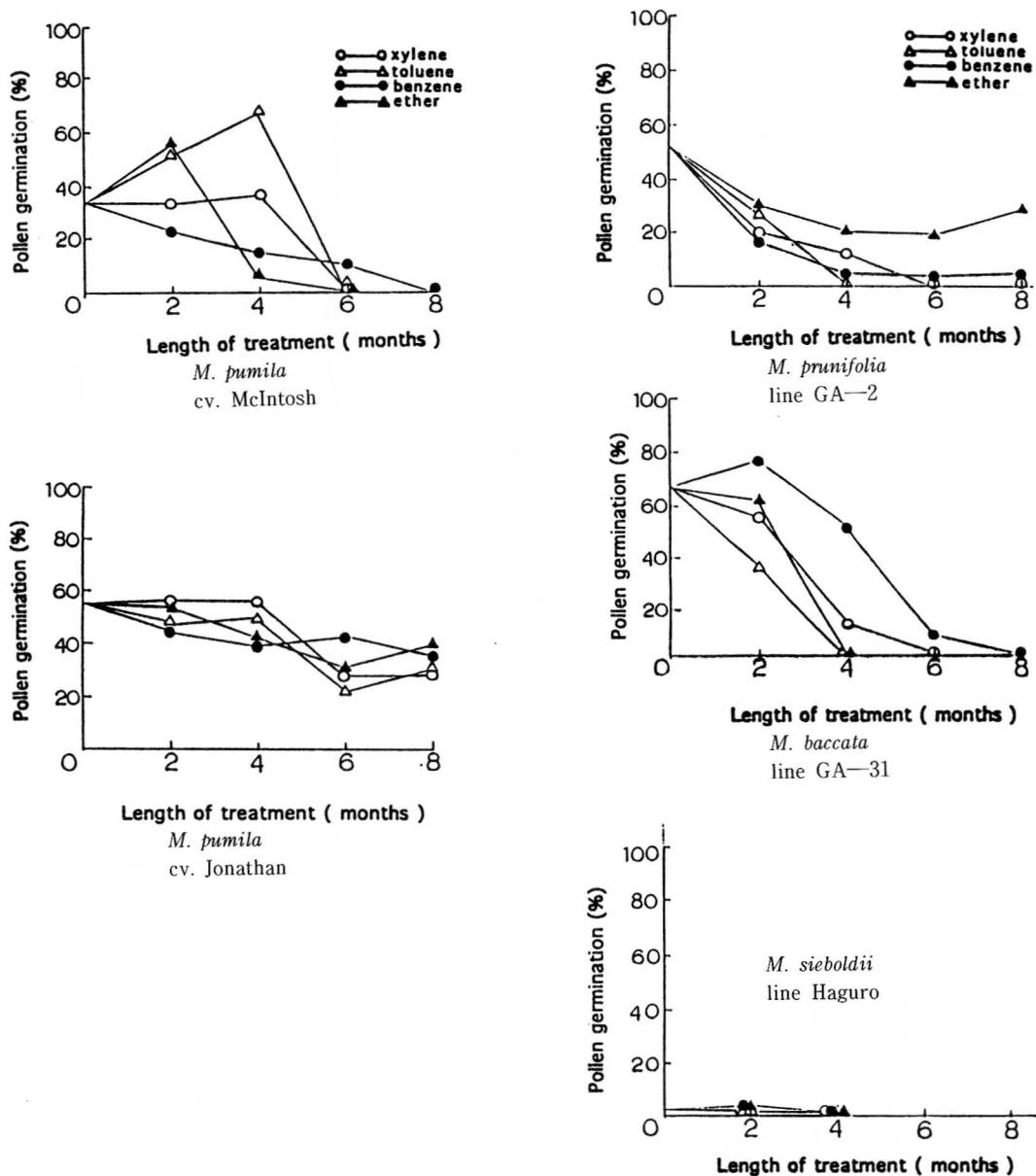


Fig. 2 Effects of temperature (-196°C) and organic solvents on pollen germination rate.

b *M. pruni*, *bacc.* については液体窒素移行操作を貯蔵開始4か月後に行った。

M. pruni. 系統：ガー2；操作を誤りベンゼン区のみの結果であったが、移行後の発芽率は貯蔵4か月後（貯蔵開始後8か月）でも変らなかったが、花粉採取時の51.9%より低く30%程度であった。

M. bacc. 系統：ガー31；キシレン、ベンゼン区は移行2か月後に発芽率の上昇を示し、移行4か月後（貯蔵開始後8か月）に低下したが、その程度は少なかった。トルエン区は移行後の発芽率の上昇は無かったが、4か月後でも花粉採取時の67.4%と殆ど変わらない発芽率を示した。エチルエーテル区は移行2か月後に発芽率の低下を示したが、4か月後に上昇し40%程度となった。

M. siebo. 系統：羽黒；無能花粉が多く、液体窒素移行処理実験は行わなかった。

花粉管伸長：

-20℃→-196℃移行区では第5図に示したように紅玉における4か月後の一時的な低下が目立ち、-20℃の場合と対照的である。また、Ga-31の花粉はトルエン区の8か月後の高値が目立っているが（第6図）、他はおおむね漸減、または6・8か月後の両者間であまり差がないという傾向を示した。

以上の結果から炭素数の多い溶媒区には長期の発芽力

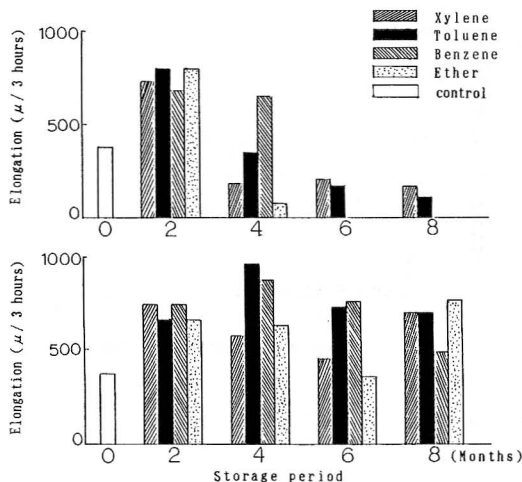


Fig. 3 Growth of pollen tubes whose pollens were stored in organic solvents at -20℃.

Upper : *M. pumila* cv. McIntosh
Below : *M. pumila* cv. Jonathan

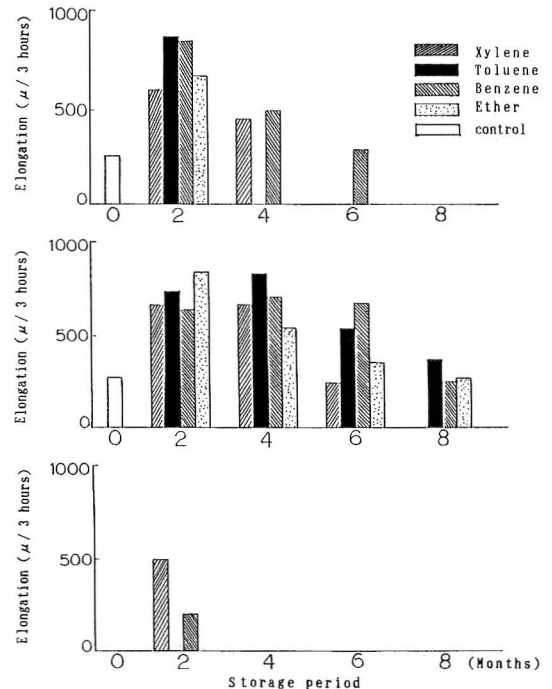


Fig. 4 Growth of pollen tubes whose pollens were stored in organic solvents at -20℃.

Upper : *M. pruni*. Ga-2
Middle : *M. bacc.* Ga-31
Below : *M. siebo.* Haguro

保持効果が認められたので、今後予備凍結処理と相俟った新たな長期間の貯蔵実験に期待したい。

5) -196℃区（1990年度結果：第2図）

栽培種 品種：旭；貯蔵開始2か月後発芽率の上昇を示したものはキシレン、トルエン、エチルエーテル区であったが、いずれも6か月には発芽力を失った。ベンゼン区は徐々に低下し8か月後に発芽力を失った。

栽培種 品種：紅玉；キシレン、トルエン区は貯蔵4か月後まで花粉採取時の55.6%と殆ど変わらない発芽率を示したが、6か月後には発芽率低下を示して30%程度となり、その状態は8か月後も続いた。ベンゼン区は発芽率低下が4か月後まで続いたが、その後は大きな変化は無く8か月後の発芽率は40%程度であった。エチルエーテル区は6か月後まで徐々に低下した発芽率は、8か月後にやや上昇し40%を超す程度となった。

M. pruni. 系統：ガー2；キシレン区は発芽率低下に伴い貯蔵6か月後に発芽力を失った。トルエン区は4

か月後に発芽力を失った。ベンゼン区は4か月後まで徐々に発芽率は低下し10%程度となり、そのままの状態が8か月後まで続いた。エチルエーテル区は6か月後ま

で発芽率は低下したが、8か月後に上昇し50%程度となった。

M. bacc. 系統：ガ—31；キシレン区は徐々に発芽率低下を示し、6か月後に発芽力を失った。トルエン、エチルエーテル区は貯蔵4か月後に発芽力を失った。ベン

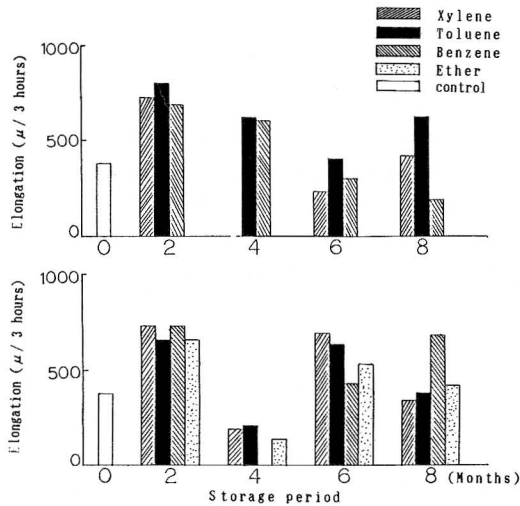


Fig. 5 Growth of pollen tubes whose pollens were stored in organic solvents at $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C}$.

Upper : *M. pumila* cv. McIntosh
Below : *M. pumila* cv. Jonathan

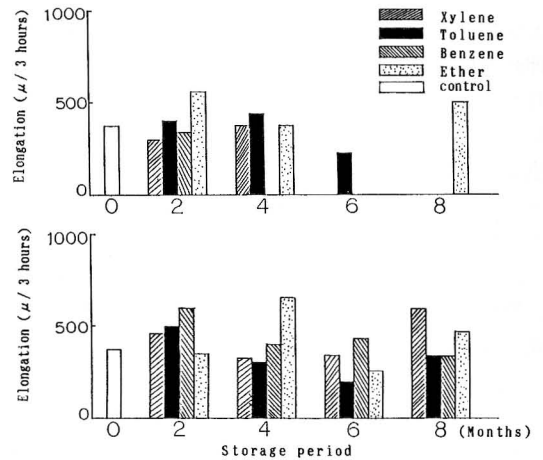


Fig. 7 Growth of pollen tubes whose pollens were stored in organic solvents at -196°C .

Upper : *M. pumila* cv. McIntosh
Below : *M. pumila* cv. Jonathan

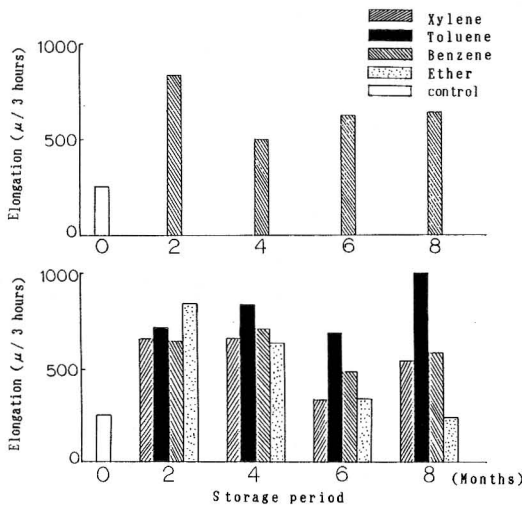


Fig. 6 Growth of pollen tubes whose pollens were stored in organic solvents at $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C}$.

Upper : *M. pruni* Ga-2
Middle : *M. bacc.* Ga-31

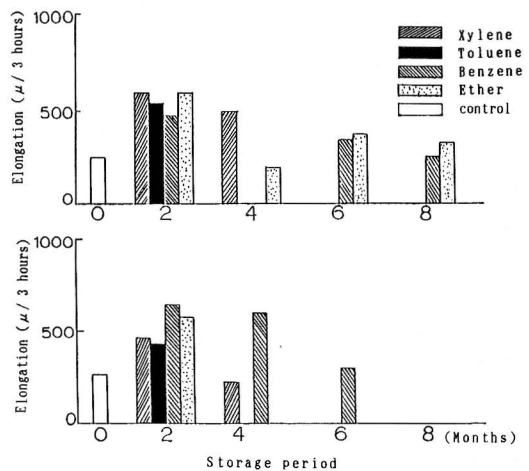


Fig. 8 Growth of pollen tubes whose pollens were stored in organic solvents at -196°C .

Upper : *M. pruni* Ga-2
Middle : *M. bacc.* Ga-31

ゼン区は発芽力の低下が最も遅れ8か月後に発芽力を失った。

M. siebo. 系統：羽黒；無能花粉が多く実験結果を明らかにすることは出来なかった。

花粉管伸長：

−196℃区では、品種：旭のエーテルを除く全処理区とGa—31の全処理区において、8か月後には花粉管の伸長が見られなかった。しかし、紅玉にあっては、8か月後でも、2か月後とあまり変わらない伸長度を保っていた。本区のみならず、先の−20℃区、変温区も含めて、供試した5種類について、発芽率の高い区では伸長が大きく、また、低い区で伸長も小さいという発芽率に応じた変化を示した。

以上の結果からは−196℃単独区では実用的花粉貯蔵は期待出来ないようであったが、予備凍結処理操作の問題は残された。

摘 要

Malus 属植物の花粉を温度（室温，−20℃，−196℃，−20℃→−196℃）と炭素数8, 7, 6, 4, の有機溶媒キシレン，トルエン，ベンゼン，エチルエーテルとの組合せ条件下で貯蔵した場合，発芽力に与えた影響は以下に示すようであった。

1. 室温5℃の温度条件下では貯蔵後2～4か月以内にいずれの有機溶媒も発芽率力を失った。
2. −20℃の条件下では貯蔵後4か月以上の発芽力を保持する区が炭素数4以上の溶媒区に認められたがその発芽程度は採取直後の花粉に見られる発芽率より劣っていた。
3. −196℃の条件下では貯蔵8か月後も発芽力を保持する有機溶媒区があったが、その発芽程度は採取直後の花粉に見られる発芽率より劣っていた。
4. −20℃→−196℃の移行処理条件下では、貯蔵8か月後も採取直後の花粉に見られる程度の発芽率を示す有機溶媒区があった。
5. 花粉管の伸長は発芽率に応じた変化を示した。

引 用 文 献

1. 市河三次：1971. 樹木花粉の超低温貯蔵に関する研究 pp. 166.
2. IWANAMI, Y. and N. NAKAMURA : 1972. Storage in organic solvent as a means for preserving viability of pollen grains. *Stain Technol.* 47 : 137-139.
3. IWANAMI, Y. : 1972. Retaining the viability of *Cameria japonica* pollen in various organic solvents. *Plant & Cell Physiol.* 13 : 1139-1141.
4. 樋浦 巖・高橋千代子：1974. リンゴ台木用マルス属 (*Malus* Spp.) 植物の系統分類 II. マルバカイドウ，ミツバカイドウおよび栽培種の葉のパーオキシダーゼアイソザイム 育学雑. 24. (別冊I)
5. 樋浦 巖・鈴木洋・今西茂：1978. リンゴ台木の育種学的研究 (1) 数種のリンゴ属植物 (*Malus* spp.) の実生の形態分離 園学雑. 要旨.
6. KING J. R. : 1961. The freeze-drying of pollens. *Econ. Bot.* 15(1) : 91-98.
7. KING J. R. : 1963. Pollination with freeze-dried pollens *Amer. J. Bot.* 50 : 662.
8. 坂本寿孝：1990. *Malus* 属植物実生群に現われた諸系統の種分類学的研究 山形大学大学院農学研究科修士論文
9. SCHOENIKE R. E. and STEWART D. M. : 1963. Fifth year results of vacuum-drying storage and additives on the viability of some Conifer pollens. *For. Sci.* No.9. 96.
10. STANLEY R. G. and PATERSEN J. : 1960. Viability of Pine pollen storage for 15 years. *Res. Note. Pacif. Sthwest. For. Rang. Exp. Sta.* No.173.
11. 高橋昌之：1986. わが国リンゴ台木の種同定に関する研究 山形大学大学院農学研究科 修士論文